

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/033616 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12M 3/00

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/010358

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. September 2002 (16.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PAN-BIOTECH GMBH [DE/DE]; Gewerbepark 13, 94501 Aidenbach (DE).

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten

Fassung:

12. Mai 2005

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEIDL, Josef [DE/DE]; Matthias-Götzstr. 8, 94501 Aldersbach (DE). SCHERZE, Wilhelm [DE/DE]; Spargelweg 11, 90765 Fürth (DE).

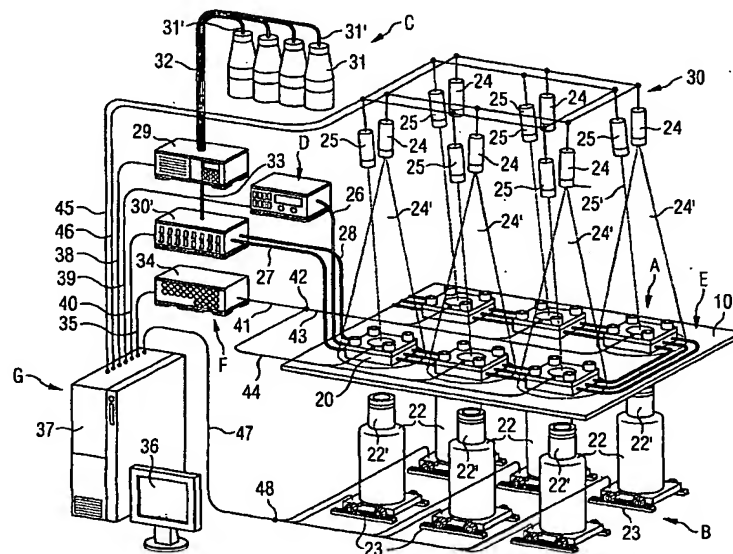
(15) Informationen zur Berichtigung:

siehe PCT Gazette Nr. 19/2005 vom 12. Mai 2005, Section II

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR CULTURING CELLS, PARTICULARLY HUMAN OR ANIMAL CELLS

(54) Bezeichnung: EINRICHTUNG ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN, INSBESONDERE MENSCHLICHER ODER TIERISCHER ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a device (30) for culturing cells of the most diverse type, particularly human or animal cells. According to the invention, a culture is prepared from cells of at least one specified type in a defined environment, and the cells of the relevant culture are supplied with assigned, liquid nutrient media, growth factors, gases and the like. Cell culturing and incubating means are provided that are configured for enabling, in at least one cell culture chamber (20) of the device (30), the culturing of cells that adapt themselves in an almost optimal manner to their living and growth conditions required in individual circumstances.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/033616 A1



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/033616 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12M 3/00

Matthias-Götzstr. 8, 94501 Aldersbach (DE). SCHERZE,  
Wilhelm [DE/DE]; Spargelweg 11, 90765 Fürth (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/010358

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. September 2002 (16.09.2002)

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): PAN-BIOTECH GMBH [DE/DE]; Gewerbepark 13,  
94501 Aidenbach (DE).

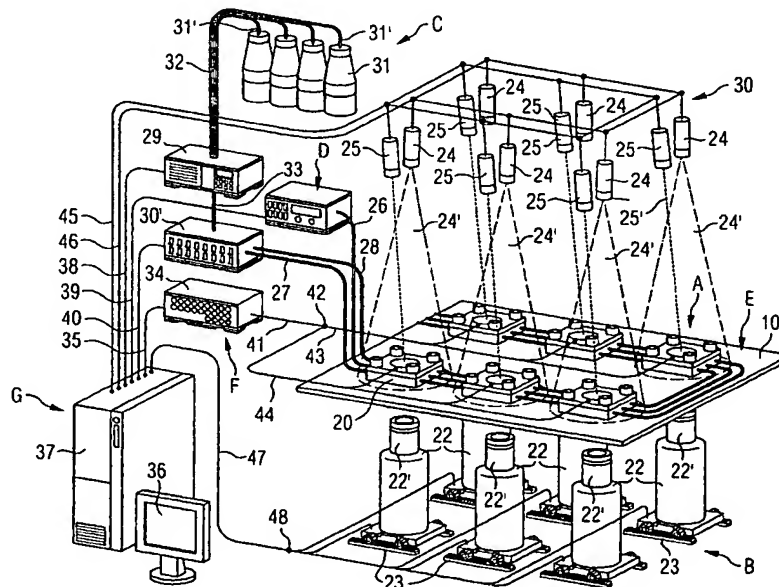
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEIDL, Josef [DE/DE];

(54) Title: DEVICE FOR CULTURING CELLS, PARTICULARLY HUMAN OR ANIMAL CELLS

(54) Bezeichnung: EINRICHTUNG ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN, INSBESONDERE MENSCHLICHER ODER TIE-  
RISCHER ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a device (30) for culturing cells of the most diverse type, particularly human or animal cells. According to the invention, a culture is prepared from cells of at least one specified type in a defined environment, and the cells of the relevant culture are supplied with assigned, liquid nutrient media, growth factors, gases and the like. Cell culturing and incubating means are provided that are configured for enabling, in at least one cell culture chamber (20) of the device (30), the culturing of cells that adapt themselves in an almost optimal manner to their living and growth conditions required in individual circumstances.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/033616 A1





---

**(57) Zusammenfassung:** Bei einer Einrichtung (30) zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung ange-  
setzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und  
dergleichen versorgt werden, sind Zellkultivierung- und Inkubationsmittel vorgesehen, die in der Weise ausgebildet sind, dass es den  
in wenigstens einer Zellkulturkammer (20) der Einrichtung (30) ausgesäten Zellen ermöglicht ist, sich ihre im individuellen Falle  
erforderlichen Lebens- und Wachstumsbedingungen in gleichsam optimaler Weise selbst einzustellen.



**Einrichtung zur Kultivierung von Zellen, insbesondere  
menschlicher oder tierischer Zellen.**

Die Erfindung betrifft eine Einrichtung zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen oder dergleichen versorgt werden.

Kulturen der vorgenannten Art werden im allgemeinen von einzelnen Zellen angesetzt, die entweder von Gewebeteilen, von primären Kulturen, von Zell-Linien oder Zell-Stämmen durch enzymatische, mechanische oder chemische Zerteilung herrühren.

Bei bisher bekannten Einrichtungen zur Zellkultivierung werden zum Ansetzen der Kulturen in der Regel aus Kunststoff bestehende Kulturgefäße verwendet, die in CO<sub>2</sub>-Brutschränken inkubiert werden. Diese garantieren eine konstante Temperatur (z.B. 37°C) und eine Pufferung des Mediums durch eine 5 % - 10 %ige CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Sauerstoffversorgung erfolgt durch einfache Diffusion. Bei den bekannten Verfahren und Einrichtungen zur Kultivierung von Zellen sind Co-Kultivierung und frei veränderliche Inkubationsbedingungen in der Regel nicht möglich.

Zur mikroskopischen Beobachtung oder zu speziellen Untersuchungen müssen die Kulturgefäße aus dem jeweiligen Brutschrank entnommen werden, wobei die Inkubation unterbrochen wird, die Zellen sich abkühlen und somit die Versuchsbedingungen nicht konstant sind.



Die bisher bekannten Verfahren und Einrichtungen zur Kultivierung von Zellen werden jedoch den Anforderungen der modernen Zellkulturtechnologie nicht mehr gerecht.

Insbesondere im Hinblick auf aktuelle Forschungsschwerpunkte in der Pharmaindustrie, die in den Bereichen Entzündung (Rheuma), Krebsbekämpfung, Herz/Kreislauf-Erkrankungen, Aids, Apoptose (programmierter Zelltod) und Blutgerinnung liegen, ist die Entwicklung und Erprobung entsprechender neuer Wirkstoffe und Medikamente mit Hilfe einer wesentlich verbesserten Einrichtung zur Kultivierung von Zellen unabdingbar, wobei eine solche Einrichtung dazu befähigt sein muß, die Substanz- und Wirkungstestung unter nahezu in-vivo-Bedingungen, d.h. mit nahezu perfekter Abbildung komplexer biologischer Systeme, vor Übertritt in die klinischen Phasen (Testung an Probanden) durchzuführen.

Mit Rücksicht auf die wie oben geschilderte Situation besteht die Forderung nach einer Möglichkeit der Simulation von Reaktionsabläufen innerhalb eines oder mehrerer Organsysteme (z.B. durch Serienschaltung von Zellkulturkammern mit Hepatozyten und anderen Zellarten, Untersuchung auf Abbauprodukte und Metabolite), damit zum einen die Zeiträume zwischen Substanzwirkungserkennung und Arzneimittelzulassung erheblich minimiert werden und zum anderen vor dem Eintritt in die klinische Testphase die notwendigen Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Substanz innerhalb eines komplexen biologischen Systems erlangt werden können.

Eine ähnliche Situation liegt beispielsweise auch im Bereich der Kosmetikindustrie vor.

Im Stand der Technik sind beispielsweise multivalente Zellkultursysteme (vgl. z.B. DE 199 15 178 A1), problemadaptierte Zellkultursysteme für spezifische Aufgabenstellungen (vgl. z.B.



WO 98/17822) oder Verfahren zur Replikation von Zellkulturen bekannt (vgl. z.B. WO 97/37001).

Ferner ist beispielsweise aus der WO 99/23206 ein Verfahren zum Mischen einer varizella-infizierten Zellkultur in Rollflaschen bekannt.

Schließlich sind aus der EP 0 999 266 A1 ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufnahme einer Zellkultur bekannt, wodurch möglichst homogene Bedingungen für die molekularbiologische oder gentechnische Untersuchung von Zellen geschaffen werden sollen.

Mit Rücksicht auf die im Vorangehenden geschilderte Situation auf dem Gebiet der modernen Zellkulturtechnologie liegt der vorliegenden Erfindung nunmehr die Aufgabe zugrunde, eine neue, verbesserte Einrichtung zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen zu schaffen, wobei diese Einrichtung die Nachteile bisher bekannter Systeme und Einrichtungen zur Zellkultivierung beseitigt und insbesondere die Möglichkeit bietet, hochkomplexe, biologische Vorgänge in Echtzeit und unter nahezu in-vivo-Bedingungen (d.h. wie im lebenden Organismus) bei gleichsam optimal angepaßten Lebens- und Wachstumsbedingungen der Zellen zu simulieren.

Ausgehend von einer Einrichtung zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden, wird die wie vorstehend definierte Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Einrichtung Zellkultivierungs- und Inkubationsmittel aufweist, die in der Weise ausgebildet sind, daß es den in wenigstens einer Zellkulturkammer



der Einrichtung ausgesäten Zellen ermöglicht ist, sich ihre im individuellen Falle erforderlichen Lebens- und Wachstumsbedingungen selbst einzustellen.

Die erfindungsgemäße Einrichtung weist hierbei vorzugsweise die Kombination folgender Merkmale auf:

- a) Mittel zum Ingangsetzen eines Flusses frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien in die wenigstens eine Zellkulturkammer zur kontinuierlichen Versorgung der dort ausgesäten Zellen;
- b) Mittel zum Ingangsetzen eines Stromes unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die wenigstens eine Zellkulturkammer zur konstanten, kontinuierlichen Begasung der dort ausgesäten Zellen;
- c) Mittel zum geregelten bzw. gesteuerten Beheizen der wenigstens einen Zellkulturkammer in der Art und Weise, daß hierin eine konstante Temperatur während der Dauer eines Versuches gewährleistet ist;
- d) Mittel zum permanenten mikroskopischen Beobachten der innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer ausgesäten Zellen, ohne während der Dauer eines Versuches Proben der Zellkultur zu entnehmen;
- e) Mittel zum permanenten Messen sämtlicher relevanten Zellkulturparameter mittels entsprechender, in die wenigstens eine Zellkulturkammer integrierter Sensoren; und
- f) der wenigstens einen Zellkulturkammer zugeordnete Feed-back-Regelungsmittel zur Optimierung von Inkubationsbedingungen in der wenigstens einen Zellkulturkammer.



Bei den relevanten Zellkulturparametern handelt es sich insbesondere um pH-Wert, Glucose, Lactat, Sauerstoff, Elektropotential und dergleichen mehr.

Bei der erfindungsgemäßen Einrichtung ist in bevorzugter Weise eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturkammern vorgesehen, die entweder in Reihe oder parallel geschaltet sein können, wobei innerhalb dieser vorgegebenen Anzahl von Zellkulturkammern vorzugsweise eine entsprechende Anzahl von Zellkulturen gleichzeitig angesiedelt wird.

Bei der erfindungsgemäßen Einrichtung zur Kultivierung von Zellen ist vor allem gewährleistet, daß die Zellen sämtlicher Kulturen mit flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen oder dergleichen kontinuierlich versorgt werden, ohne daß die Zellen einer Kultur ihrer gewohnten, definierten Umgebung entnommen werden müssen, während gleichzeitig sämtliche Zellkulturen ohne Unterbrechung der Begasung permanent mikroskopisch beobachtet werden können.

Gemäß weiterer Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Einrichtung sind Mittel vorgesehen, um während der Dauer eines Versuchs die Art der flüssigen Medien und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder deren Durchflußmengen zu variieren. Darüberhinaus können aber auch Mittel vorgesehen sein, um während der Dauer eines Versuchs die Art der Gase und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder die Begasungskonzentrationen zu variieren.

Die vorgenannten Variationsmöglichkeiten gewährleisten eine außerordentlich flexible Funktionsweise der erfindungsgemäßen Einrichtung.

Im Falle von in Reihe geschalteten Zellkulturkammern der erfindungsgemäßen Einrichtung können beispielsweise die flüssigen



Medien und/oder die Gase von Zellkulturkammer zu Zellkulturkammer kontinuierlich weitergeleitet werden.

Um bei der erfindungsgemäßen Einrichtung zur Zellkultivierung während der Dauer eines Versuchs in den einzelnen Zellkulturkammern konstante Temperaturen zu gewährleisten, weist die Einrichtung in bevorzugter Weise Mittel auf, um die in den einzelnen Zellkulturen herrschenden Temperaturen permanent zu messen und als Temperatur-Istwerte einem entsprechenden Temperaturregel- bzw. Temperatursteuerkreis einzugeben, so daß die Beheizung der jeweiligen Zellkulturkammer entsprechend geregelt bzw. gesteuert wird.

Wie weiter unten im einzelnen noch näher erläutert wird, weist zu diesem Zweck jede einzelne Zellkulturkammer eine eigene Heizung auf, während oberhalb der betreffenden Zellkulturkammer jeweils ein Infrarot-Temperaturmesser angeordnet ist, der die in der betreffenden Zellkultur herrschende Temperatur mißt und diesen Temperaturmeßwert an ein Überwachungs- und Steuerungssystem meldet. Ändert sich die anfangs vorgegebene Temperatur in der wenigstens einen Zellkulturkammer, dann wird durch den Temperaturregel- bzw. Steuerkreis bewirkt, daß die Heizleistung der jeweiligen Zellkulturkammerbeheizung vermindert bzw. erhöht wird.

Die Temperaturmessung kann aber auch mit Hilfe anderer Temperatursensoren erfolgen.

Wie ebenfalls weiter unten noch näher erläutert wird, sind aus Flexibilitätsgründen die Temperaturen in den einzelnen Zellkulturkammern durch das Überwachungs- und Steuerungssystem während der gesamten Versuchsdauer frei einstellbar und veränderbar.

Eine weitere, besonders vorteilhafte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Einrichtung besteht darin, daß sie wenigstens eine



Zellkulturkammer aufweist, in der eine gasdurchlässige Membran in der Weise angeordnet ist, daß zu beiden Seiten dieser Membran je eine Zellkultur unterschiedlicher Art zum Zwecke einer direkten Co-Kultivierung beider Zellkulturen ansetzbar ist, wobei Mittel zum Ingangsetzen eines ersten Medienflusses zu der einen Seite der Membran, d.h. der apikalen Seite mit der ersten Zellkultur, und eines gegenüber dem ersten Medienfluß unterschiedlichen, zweiten Medienflusses zu der anderen Seite der Membran, d.h. der basolateralen Seite mit der zweiten Zellkultur, vorgesehen sind.

Somit funktionieren die auf der apikalen Seite wachsenden Zellen als Deckschicht, während die Zellen auf der basolateralen Seite als Innenzellen funktionieren. Die Zellen der ersten Zellkultur und die Zellen der zweiten Zellkultur weisen hierbei durch die Membran einen recht engen Kontakt zueinander auf, so daß die Möglichkeit besteht, Austauschvorgänge innerhalb der Schichten auf der apikalen Seite und der basolateralen Seite zu untersuchen.

Darüberhinaus besteht noch die Möglichkeit, daß dann, wenn bei der erfindungsgemäßen Einrichtung gasdurchlässige Membranen mit unterschiedlichen, wählbaren Porengrößen eingesetzt werden, ein möglicher Austausch von wirksamen bioaktiven Molekülen (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, usw.) im Zuge einer derartigen Co-Kultivierung untersucht werden kann. Solche Untersuchungsmöglichkeiten sind insbesondere bei Gewebeteilen wichtig, die aus verschiedenen Zellarten aufgebaut sind, beispielsweise Übergang Endothelzellen-Fibroblasten (Adern) oder Schleimhautzellen-Fibroblasten (Darm, Magen).

Die erfindungsgemäße Einrichtung kann im übrigen mit besonderem Vorteil zur indirekten Co-Kultivierung Anwendung finden, wobei verschiedene biologische Systeme (Gewebe-/Zellarten) in entsprechenden Zellkulturkammern hintereinander geschaltet werden.



Auf diese Weise lassen sich ganze Organsysteme gleichsam nachbauen und die entsprechenden Stoffwechselvorgänge untersuchen. Diese Maßnahmen lassen sich durch ein Beispiel näher erläutern: ein an sich ungiftiger Stoff wird über den Verdauungstrakt aufgenommen und gelangt über den Blutstrom in die Leber. Die Leberzellen bauen den Stoff in Abbauprodukte um, die unter Umständen toxisch wirken können. Um dies zu überprüfen, wird die "verdächtige" Substanz in eine Inkubationskammer eingegeben, die mit Hepatozyten (Leberzellen) besiedelt ist. Über eine definierte Nährmedienversorgung (Medienfluß = "Ader") gelangen eventuell toxische Abbauprodukte in eine sich anschließende Zellkulturkammer, so daß dort z.B. aus absterbenden Nervenzellen auf eine neurotoxische Substanz geschlossen werden kann.

Gemäß einer weiteren, außerordentlich vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Einrichtung ist ein videounterstütztes mikroskopisches Beobachtungssystem zum Beobachten der wenigstens einen Zellkultur in der wenigstens einen Zellkulturkammer vorgesehen, wie dies weiter unten noch im einzelnen erläutert wird.

Schließlich besteht noch eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Einrichtung darin, daß sie computer-gesteuertes Überwachungs- und Steuerungssystem aufweist, zu dem sämtliche Daten, die gewonnen werden durch

- permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer und/oder
- permanentes Messen der relevanten Zellkulturparameter und/oder



- permanentes Messen der in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer herrschenden Temperatur,

zur dortigen Weiterverarbeitung und entsprechenden Beaufschlagung der Feedback-Regelungsmittel übertragbar sind.

Bei den Feedback-Regelungsmitteln handelt es sich insbesondere um Regelungsalgorithmen, die in einer Datenverarbeitungsanlage des computergesteuerten Überwachungs- und Steuerungssystems enthalten sind.

In diesem Zusammenhang ist zum permanenten Messen der relevanten Zellkulturparameter ein software-unterstütztes Meßsystem vorgesehen.

Eine kontinuierliche Messung von Zellkulturparametern läßt sich vorzugsweise durch spezielle Sonden bzw. Sensoren, beispielsweise für pH-Wert, Lactat, Elektropotential und dergleichen mehr, durchführen, wobei diese Messungen durch eine entsprechende Software ausgewertet und dargestellt werden können. Diese Art der Messung liefert gegenüber herkömmlichen Methoden exaktere Ergebnisse, wodurch bestimmte Fragestellungen analysiert werden können, die mit bisher verwendeten Meßverfahren nicht durchführbar sind.

Mit Hilfe eines bei der erfindungsgemäßen Einrichtung zum Einsatz gelangenden, software-unterstützten Meßsystems lassen sich beispielsweise bestimmte Tierversuche in der präklinischen Phase größtenteils ersetzen.

Zusammenfassend bietet die erfindungsgemäße Einrichtung zur Kultivierung von Zellen insbesondere die folgenden Vorteile:



1. Möglichkeit einer Parallelschaltung einer vorgegebenen Anzahl von Zellkulturkammern innerhalb der Einrichtung für Vergleichsmessungen.
2. Möglichkeit einer seriellen Schaltung einer vorgegebenen Anzahl von Zellkulturkammern innerhalb der Einrichtung für Organsimulation.
3. Möglichkeit einer variablen Temperaturregelung bzw. -steuerung.
4. Möglichkeit einer variablen Begasung der einzelnen Zellkulturkammern.
5. Möglichkeit einer individuellen Versorgung der Zellkulturen mit Nährsubstanzen bzw. Wirkstoffen.
6. Möglichkeit einer permanenten mikroskopischen Beobachtung des Inneren der einzelnen Zellkulturkammern und einer entsprechenden Videoaufzeichnung ohne Unterbrechung des Zellkultivierungsprozesses.
7. Möglichkeit einer permanenten Messung verschiedener Zellkulturparameter mittels integrierter Sensorik.
8. Bereitstellung eines hochwertigen Mehrwegsystems, d.h. Verarbeitung von Edelstahl und Quarzglas von voll autoklavierbarer Struktur zur Reduzierung von Abfall.

Die Erfindung wird nunmehr nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, wobei zeigen:

Figur 1 eine schematische Ansicht einer Einrichtung zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen; und



Figur 2 eine schematische Darstellung einer auf einer Basis der Einrichtung nach Figur 1 angeordneten Zellkulturkammergruppierung, zu der eine vorgegebene Anzahl von einzelnen Zellkulturkammern zusammengefaßt ist.

Figur 1 zeigt schematisch eine Einrichtung 30 zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung innerhalb einer zugeordneten Zellkulturkammer angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit vorgewählten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden.

Diese Einrichtung 30 ist insgesamt betrachtet so konzipiert, daß sie Zellkultivierungs- und Inkubationsmittel aufweist, die in der Weise ausgebildet sind, daß es den in den Zellkulturkammern der Einrichtung 30 ausgesäten Zellen ermöglicht ist, sich ihre im individuellen Falle erforderlichen Lebens- und Wachstumsbedingungen selbst einzustellen, d.h. insbesondere mit dem Ziel, daß diese Lebens- und Wachstumsbedingungen gleichsam optimiert werden.

Bei der in Figur 1 dargestellten Einrichtung 30 sind beispielsweise sechs Zellkulturkammern 20 in Form einer Zellkulturkammergruppierung A auf einer entsprechend zugeordneten Basis 21 platziert. Insbesondere bildet die Basis 21 ein Heizsystem E für die Inkubierung, das während der Betriebszeit die Einrichtung 30 konstante Temperaturen innerhalb jeder der Zellkulturkammern 20 gewährleistet.

Vorzugsweise erfolgt mit Hilfe dieses Heizsystems E eine elektrische Beheizung der jeweiligen Zellkulturkammer 20, wodurch eine sehr genaue Temperaturregelung ermöglicht ist. Dieses Heizsystem E ist insbesondere in der Weise ausgelegt, daß jede einzelne Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A



über ihre eigene Heizung verfügt, die in der Basis 21 integriert ist.

Mit besonderem Vorteil ist das Heizsystem E mittels einer zugeordneten Software steuerbar. Zu diesem Zweck ist oberhalb der Zellkulturkammergruppierung A ein System aus Infrarot-Temperaturmessern 25 installiert, in der Art, daß jeder einzelnen Zellkulturkammer 20 ein entsprechender Infrarot-Temperaturmesser 25 zugeordnet ist. Der jeweilige Infrarot-Temperaturmesser 25 fühlt in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 die in der Zellkultur vorherrschende Temperatur ab und meldet das entsprechende Meßergebnis permanent an ein computergesteuertes Überwachungs- und Steuerungssystem G, das im wesentlichen aus einer Datenverarbeitungsanlage 37 und einem zugehörigen Monitor 36 besteht. Die einzelnen Infrarot-Temperaturmesser 25 sind über eine gemeinsame Verbindungsleitung 45 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen. Wenn sich die Anfangs vorgegebenen Temperaturen in den Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A ändern, erfolgt automatisch über das Überwachungs- und Steuerungssystem G eine Steuerung bzw. Regelung des Heizsystems E, d.h., die in der einzelnen Zellkulturkammer 20 herrschende Temperatur wird permanent auf einer konstante Temperatur eingeregelt.

Anstatt mittels Infrarot-Temperaturmessern könnte die Temperaturmessung in der einzelnen Zellkulturkammer 20 aber auch mit Hilfe anderer Temperatursensoren durchgeführt werden.

Darüberhinaus kann mit Hilfe der in dem Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltenen Software ermöglicht werden, daß die Temperaturen in den einzelnen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A während der gesamten Versuchsdauer frei einstellbar und wählbar sind, falls dies aus bestimmten Gründen erforderlich sein sollte.



Zum Zwecke einer permanenten, videogestützten mikroskopischen Beobachtung des Inneren der jeweiligen Zellkulturkammer 20 ist ein Videosystem B mit einem entsprechend zugeordneten Mikroskopsystem vorgesehen. Dieses Videosystem B wird im folgenden näher erläutert.

Unterhalb jeder einzelnen Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A, die im vorliegenden Ausführungsbeispiel insgesamt sechs Zellkulturkammern aufweist, ist eine Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' auf einem mechanisch einstellbaren Fahrtisch 23 angeordnet, somit insgesamt sechs Videokameras 22 mit zugehörigem Mikroskopaufsatz 22'. Infolgedessen beobachtet je eine Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' je eine Zellkulturkammer 20. Nach Versuchsstart und nachdem sich aussagekräftige Bereiche in der jeweiligen in der Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellkultur abzeichnen, wird ein Beobachtungssektor in der Zellkulturkammer 20 festgelegt. Dieser Beobachtungssektor wird sodann durch den mechanisch einstellbaren Fahrtisch 23 mittels (nicht dargestellter) Einstellschrauben angefahren, sodann wird der Fahrtisch arretiert und das Videosystem B bleibt infolgedessen während der gesamten Versuchsdauer in der gleichen Position. Ferner wird bei Versuchsstart die Schärfe der Einstellung am jeweiligen Mikroskopaufsatz 22' einjustiert. Dieser Justiervorgang am jeweiligen Mikroskopaufsatz 22' erfolgt für sämtliche sechs Zellkulturkammern 20 und bleibt sodann unverändert bis zum Versuchsende.

Vorzugsweise wird auch das Videosystem B über die im Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltene Software gesteuert. Hierbei wird jede einzelne Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' gesteuert. Dies erfolgt insbesondere in der Art, daß in frei wählbaren Zeitintervallen (beispielsweise im Minutentakt) Bilder von der jeweiligen Zellkultur in der Zellkulturkammer 20 aufgenommen werden, wobei zu dem jeweiligen Zeitpunkt einer solchen Aufnahme eine oberhalb der jeweiligen Zellkulturkammer



20 angeordnete Lichtquelle 24 die entsprechende Zellkultur beleuchtet, so daß eine ausreichende Ausleuchtung im Inneren der Zellkulturkammer 20 für die Videoaufnahmen gewährleistet ist. Wenn die Videoaufnahme beendet ist, schaltet die Steuerung die jeweilige Lichtquelle 24 aus, bis die nächste Videoaufnahme gemacht wird. Der von einer jeden Lichtquelle 24 ausgehende Lichtstrahl bzw. Lichtkegel, der in das Innere einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 durch eine entsprechende (nicht dargestellte) Glasscheibe eintritt, ist in Figur 1 mit 24' bezeichnet.

Sämtliche Lichtquellen 24 sind über eine gemeinsame Verbindungsleitung 46 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen.

Durch jeden einzelnen Lichtstrahl bzw. Lichtkegel 24 wird die jeweilige, in der Zellkulturkammer 20 enthaltene Zellkultur flächendeckend ausgeleuchtet. Es handelt sich hierbei um eine Durchleuchtungsmethode.

Anstelle einer solchen Durchleuchtungsmethode könnte aber vorgesehen sein, daß die Lichtquellen zur Ausleuchtung der in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellkultur unmittelbar an der jeweils zugeordneten Videokamera 22 bzw. dem jeweils zugeordneten Mikroskopaufsatz 22' angebracht sind, so daß in einem solchen Falle die Durchleuchtungsmethode durch eine Draufsichtmethode ersetzt ist.

Das Videosystem B ist ebenfalls über eine Leitung 47 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen, wobei von diesem aus die Leitung 47 zu einem Knotenpunkt 48 führt, mit dem die einzelnen Videokameras 22 über entsprechend zugeordnete Leitungen verbunden sind.

Das wie oben erläuterte Videosystem B mit Mikroskopsystem stellt nur eine Ausführungsmöglichkeit dar. Eine mögliche ande-



re Ausführungsform eines solchen Systems zur permanenten Beobachtung des Inneren der Zellkulturkammern besteht darin, daß ein einziges Beobachtungssystem, bestehend aus Videokamera und Mikroskopaufsatz, auf einem Fahrtisch installiert wird und daß dieser Fahrtisch die sechs Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A in frei wählbaren Intervallen abfährt. Die Justierung des Beobachtungssystems erfolgt für die einzelne Zellkultur bei Versuchsstart, d.h. vorzugsweise dann, nachdem sich aussagekräftige Bereiche in der jeweiligen Zellkultur abzeichnen, durch die entsprechende, im Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltene Software, d.h., durch das entsprechende Computerprogramm sind die sechs Anfahrpositionen des Fahrtisches, auf dem das Beobachtungssystem montiert ist, programmiert. Wegen der mechanischen Toleranzen des Fahrtisches muß jedoch ein größerer als der zu beobachtende Bereich innerhalb der einzelnen Zellkulturkammer 20 aufgenommen werden. Innerhalb dieses größeren Bereichs wird nun mittels der Software der zu beobachtende Bereich definiert. Die Software ist in der Lage, Konturen zu speichern und wiederzuerkennen, d.h., beim erneuten Anfahren einer Zellkulturkammer werden die Kultur und die Anordnung der Zellen erkannt und ein anfänglich definierter Beobachtungsbereich gespeichert.

Dieses zuletzt erläuterte Beobachtungssystem ist in den Zeichnungen im einzelnen nicht dargestellt, jedoch erfolgt die Ausleuchtung der einzelnen Zellkulturkammer 20 ebenfalls mit Hilfe der Lichtquellen 24, wie bereits weiter oben im einzelnen erläutert.

Auch in diesem Falle besteht die Möglichkeit, die Durchleuchtungsmethode durch die Draufsichtmethode zu ersetzen, d.h., die Lichtquellen zur Ausleuchtung der in der einzelnen Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellen können unmittelbar an der jeweils zugeordneten Videokamera 22 bzw. an dem jeweils zugeordneten Mikroskopaufsatz 22' angebracht sein.



Die in Figur 1 dargestellte Einrichtung 30 weist ferner noch ein Dosiersystem C für Flüssigkeiten (z.B. flüssige Nährmedien und dergleichen) auf, welche z.B. vier Flüssigkeitsvorratsbehälter 31 mit einer jeweils zugeordneten Flüssigkeitsentnahmeleitung 31' aufweist, wobei sodann aus diesen Flüssigkeitsentnahmeleitungen 31' ein Leitungsbündel 32 gebildet ist. Dieses Leitungsbündel 32 ist andererseits mit einem Pumpensystem 29 verbunden, durch welches die verschiedenen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A mit frei wählbaren Flüssigkeiten, die in den Flüssigkeitsvorratsbehältern 31 enthalten sind, versorgt werden.

Das Pumpensystem 29 ist seinerseits über eine Leitung 33 an ein Multiventilmodul 30' angeschlossen. Die Zuführung der Flüssigkeiten zu der Zellkulturkammergruppierung A erfolgt von dem Multiventilmodul 30' aus über sterile Schlauchleitungssysteme 27 und 28, wobei diese Flüssigkeiten von den einzelnen Zellkulturkammern 20 flexibel weitergeleitet werden, d.h. von einer Zellkulturkammer zur nächsten, wie dies noch weiter unten anhand der Figur 2 näher erläutert wird.

Sowohl die Flüssigkeitszuführung als auch die Flüssigkeitsweiterleitung erfolgen über sterile Schlauchsysteme, die mit Standard-Schlauchverbinder-elementen und Verteilern bei Versuchstart installiert werden, d.h., mit entsprechenden Versorgungskanälen einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 verbunden werden. Hierbei wird die Verbindung der Standard-Schlauchelemente (in den Zeichnungen im einzelnen nicht dargestellt) mit den zugeordneten Versorgungskanälen der jeweiligen Zellkulturkammer 20 so aufeinander abgestimmt, daß die Sterilität gewährleistet ist.

Aus Gründen der Flexibilität können die Art der Flüssigkeiten und/oder die Strömungsrichtungen und/oder die Verteilung der Flüssigkeiten und/oder deren Durchflußmengen während des Ver-



suchs geändert bzw. gesteuert werden, wobei eine derartige Steuerung vorzugsweise durch das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G erfolgt. Zu diesem Zweck sind das Pumpensystem 29 mittels einer Verbindungsleitung 38 und das Multiventilmodul 30' über eine Verbindungsleitung 40 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen.

Das Dosiersystem C der Einrichtung 30 erlaubt es somit, der Zellkulturkammergruppierung A unterschiedlichste Flüssigkeiten zuzuführen.

Die Einrichtung 30 weist darüberhinaus ein Begasungssystem D für unterschiedlichste Gase auf. Dieses Begasungssystem D dient dazu, die verschiedenen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A mit unterschiedlichen Gasen, z.B. Luft, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, zu begasen. Von dem Begasungssystem D aus erfolgt die Gaszuführung zu der Zellkulturkammergruppierung A mittels einer sterilen Schlauchleitung 26. Auch hierbei können die Gase von den verschiedenen Zellkulturkammern 20 unter Verwendung entsprechend zugeordneter Versorgungskanäle flexibel weitergeleitet werden, d.h., von einer Zellkulturkammer zur nächsten (vgl. Figur 2).

Gaszuführung und Gasweiterleitung erfolgen insgesamt über sterile Schläuche, die mittels Standard-Schlauchverbinder-elementen und Verteilern bei Versuchsstart installiert werden. Die Verbindungen der Schlauchverbinder-elemente mit den entsprechend zugeordneten Versorgungskanälen einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 sind so aufeinander abgestimmt, daß die Sterilität gewährleistet ist. Auch bei dem Begasungssystem D können aus Flexibilitätgründen die Art der Gase und/oder die Strömungsrichtungen und/oder die Gasverteilung und/oder die Begasungskonzentration während des Versuchs geändert bzw. gesteuert werden. Zu diesem Zweck ist wiederum das Begasungssystem D über eine Verbindungsleitung 39 an das computergesteuerte Überwachungs- und



Steuerungssystem G angeschlossen, das die entsprechende Software für die Steuerung des Begasungssystems D enthält.

Schließlich weist die Einrichtung 30 zur Kultivierung von Zellen noch ein Monitoring-System F mit vorgegebenen Sensormodulen 34 auf. Mit Hilfe des Monitoring-Systems F können während der gesamten Versuchsdauer die relevanten Parameter in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A mittels entsprechend zugeordneter Sensoren gemessen, insbesondere permanent gemessen werden, wobei es sich bei diesen Parametern z.B. um pH-Wert, Glucose, Lactat, Sauerstoff, Elektropotential usw. handelt. Zu diesem Zweck steht das Monitoring-System F über eine Leitung 41, über einen Knotenpunkt 42 und von dort aus über weitere Leitungen 43 und 44 und entsprechend zugeordnete Abzweigleitungen mit den Sensoren an den einzelnen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A der Einrichtung 30 in Verbindung.

Die von den (nicht gezeigten) Sensoren gemessenen Parameter werden von dem Monitoring-System F über eine Leitung 35 an das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G zur entsprechenden Weiterverarbeitung und nachfolgenden Beaufschlagung der Feedback-Regelungsmittel weitergeleitet.

Jede Zellkulturkammer 20 weist entsprechende Sensorikanschlußkanäle auf, wie dies weiter unten noch im einzelnen erläutert wird, wobei die Sensoren und die jeweils zugeordneten Kanäle so aufeinander abgestimmt sind, daß die Sterilität gewährleistet ist.

Mit besonderem Vorzug ist das Monitoring-System F in Verbindung mit dem computergesteuerten Überwachungs- und Steuerungssystem G in der Weise ausgelegt, daß das permanente Messen der relevanten Zellkulturparameter mit Hilfe eines software-unterstützt-



ten Meßverfahrens erfolgen kann (wie bereits weiter oben erläutert).

Aus Figur 2 ist die Zellkulturkammergruppierung A der Einrichtung 30 gemäß Figur 1 in schematischer Draufsicht zu ersehen. Bei der auf der Basis 21 angeordneten Zellkulturkammergruppierung A sind insgesamt sechs Zellkulturkammern 20 gleichsam in Reihe geschaltet, derart, daß sowohl die flüssigen Medien als auch die Gase von einer Zellkulturkammer 20 zur anderen, d.h. zur jeweils nachfolgend angeordneten Zellkulturkammer 20 kontinuierlich weitergeleitet werden können.

In jeder der sechs Zellkulturkammern 20 wird mindestens eine zu untersuchende Zellkultur angesiedelt, wobei jedoch im vorliegenden Ausführungsbeispiel der Einfachheit halber von sechs Zellkulturen gesprochen wird, deren jeweiligen Zellen mit definierten flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen mehr zu versorgen sind.

Zu diesem Zweck wird einerseits ein Fluß frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien und andererseits ein Strom unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die sechs Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A in Gang gesetzt, wobei, wie bereits weiter oben erläutert, die Zuführung der Flüssigkeiten zu der Zellkulturkammergruppierung A primär von dem Multiventilmodul 30' gemäß Figur 1 aus über die sterilen Schlauchleitungssysteme 27 und 28 erfolgt, während gleichzeitig die Gaszuführung zu der Zellkulturkammergruppierung A von dem Begasungssystem D gemäß Figur 1 aus mittels der sterilen Schlauchleitung 26 erfolgt.

Zur Erleichterung der Übersicht sind die sechs aufeinanderfolgend in Reihe geschalteten Zellkulturkammern 20 mit I, II, III, IV, V und VI gekennzeichnet.



Die Schlauchleitungssysteme 27 und 28 für Flüssigkeiten und die Schlauchleitung 26 für Gase sind unmittelbar mit der ersten Zellkulturkammer I verbunden, derart, daß die Schlauchleitung 26 unmittelbar in einen Gaskanal 50 im Inneren dieser ersten Zellkulturkammer I mündet, wohingegen das Schlauchleitungssystem 27 in einen entsprechenden Flüssigkeitskanal 51 und das Schlauchleitungssystem 28 in einen Flüssigkeitskanal 52 jeweils im Inneren dieser ersten Zellkulturkammer I einmünden. Somit wird zunächst die in der ersten Zellkulturkammer I enthaltene Zellkultur mit flüssigen Medien und Gasen versorgt, woraufhin sukzessive die nachfolgenden Zellkulturkammern II bis VI in entsprechender Weise mit flüssigen Medien und Gasen versorgt werden. Im einzelnen ist die Zellkulturkammer I über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27A und 28A und über eine Gas-Schlauchleitung 26A mit der zweiten Zellkulturkammer II verbunden, diese wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27B und 28B und eine Gas-Schlauchleitung 26B mit der dritten Zellkulturkammer III verbunden, die ihrerseits wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27C und 28C und eine Gas-Schlauchleitung 26C mit der vierten Zellkulturkammer IV verbunden ist, während diese wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27D und 28D sowie über eine Gas-Schlauchleitung 26D mit der fünften Zellkulturkammer V verbunden ist, und schließlich ist die letztere über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27E und 28E und über eine Gas-Schlauchleitung 26E mit der sechsten Zellkulturkammer VI verbunden.

Aufgrund dieser Hintereinanderschaltung der sechs Zellkulturkammern 20, d.h. der Kammern I bis VI, mündet jede Flüssigkeits-Schlauchleitung 28A bzw. 28B bzw. 28C bzw. 28D bzw. 28E jeweils in einen Flüssigkeitskanal 52 im Inneren jeder Zellkulturkammer, jede Flüssigkeits-Schlauchleitung 27A bzw. 27B bzw. 27C bzw. 27D bzw. 27E mündet in einen entsprechenden Flüssigkeitskanal 51 im Inneren jeder Zellkulturkammer, wohingegen jede Gas-Schlauchleitung 26A bzw. 26B bzw. 26C bzw. 26D bzw. 26E



in einen entsprechenden Gas-Kanal 50 jeder Zellkulturkammer einmündet.

Von der sechsten Zellkulturkammer VI aus gehen Flüssigkeits-Ausgangsleitungen 27F und 28F und eine Gas-Ausgangsleitung 26F ab.

Infolgedessen wird ermöglicht, daß sämtliche Zellkulturen in den sechs Zellkulturkammern I bis VI sowohl mit frei wählbaren, definierten, flüssigen Medien kontinuierlich versorgt werden als auch einer konstanten, kontinuierlichen Begasung durch das Begasungssystem D gemäß Figur 1 unterworfen werden, wie im einzelnen bereits weiter oben erläutert.

Es wird darauf hingewiesen, daß in Figur 2 lediglich eine von vielen Flußrichtungsmöglichkeiten für Flüssigkeiten und Gase dargestellt ist. Durch die oben erläuterten, flexiblen Schlauchleitungssysteme für Flüssigkeiten und Gase können auch andere Zellkulturkammer-Kombinationen als die in Figur 2 gezeigte angesteuert werden.

Von ganz besonderer Bedeutung ist noch, daß die Zellkulturkammergruppierung A insgesamt permanent an das Monitoring-System F gemäß Figur 1 angeschlossen ist, damit während der gesamten Versuchsdauer alle relevanten Parameter in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 mittels entsprechend zugeordneter Sensoren gemessen werden können. Jede der sechs Zellkulturkammern 20 ist daher in ihrem Innern mit einem entsprechenden Kanal 53 für den Sensorikanschluß ausgerüstet. Im einzelnen ist hierbei die erste Zellkulturkammer I über eine Leitung 44A, die zweite Zellkulturkammer II über eine Leitung 44B und die dritte Zellkulturkammer III über eine Leitung 44C mit einer Leitung 44 verbunden, während die vierte Zellkulturkammer IV über eine Leitung 43A, die fünfte Zellkulturkammer V über eine Leitung 43B und die sechste Zellkulturkammer VI über eine Leitung 43C mit



einer Leitung 43 verbunden ist. Die Leitungen 43 und 44 führen zu einem Knotenpunkt 42, der über eine Leitung 41 mit dem Monitoring-System F gemäß Figur 1 verbunden ist.

Mit Hilfe der im Inneren einer jeden Zellkulturkammer 20 (im vorliegenden Ausführungsbeispiel die Kammern I bis VI) angeordneten Sensoren, die hier im einzelnen nicht dargestellt sind, ist es möglich, die relevanten Parameter permanent zu messen, wobei sodann die jeweiligen Meßwerte über das Monitoring-System F an das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G gemäß Figur 1 zur entsprechenden Weiterverarbeitung und anschließenden Beaufschlagung der ebenfalls in dem Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltenen Feedback-Regelungsmittel weitergeleitet werden.

Aus Figur 2 ist noch ersichtlich, daß jede Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A an ihrer Oberseite ein rundes Fenster 20A mit Glasscheibe aufweist, durch das eine flächendeckende Ausleuchtung der in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellkultur ermöglicht ist, wie bereits weiter oben anhand der Figur 1 im einzelnen erläutert.

Die Zellkulturkammer als solche bildet im übrigen den Gegenstand einer deutschen Patentanmeldung der gleichen Anmelderin mit der Bezeichnung "Zellkulturkammer für ein Zellkultursystem" (amtliches Aktenzeichen .....).

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Einrichtung zur Kultivierung von Zellen können hochkomplexe biologische Vorgänge in Echtzeit und nahezu unter in-vivo-Bedingungen simuliert werden.

Mit ganz besonderem Vorteil kann die erfindungsgemäße Einrichtung vor allem zur Erforschung von Zellfunktionen, zur Wirksamkeitsuntersuchung von Medikamenten, zur Arzneimittelentwicklung, zur CO-Kultivierung verschiedener Zelltypen und Gewebe-



teile, zu organtypischen Studien, zur Beobachtung von Tumorzellen in typischer Umgebung oder toxikologischen Studien angewendet werden.

Der Vollständigkeit halber wird noch darauf hingewiesen, daß sich die erfindungsgemäße Einrichtung in der Weise abwandeln läßt, daß der oben erläuterte Feedback-Regelungsmechanismus (Regelungsmittel, Regelungsalgorithmen) nicht in Funktion gesetzt wird, was also praktisch bedeutet, daß man den Zellkultivierungsvorgang sich selbst überläßt, ohne die Inkubationsbedingungen durch den Feedback-Regelungsmechanismus zu beeinflussen.

Bei dieser Betriebsvariante der erfindungsgemäßen Einrichtung zur Kultivierung von Zellen werden die Zellkulturparameter a priori eingestellt, aber während des Zellkultivierungsvorgangs nicht verändert, obwohl sie auch bei der zuletzt erläuterten Betriebsvariante permanent gemessen werden.



### Patentansprüche

1. Einrichtung zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (30) Zellkultivierungs- und Inkubationsmittel aufweist, die in der Weise ausgebildet sind, daß es den in wenigstens einer Zellkulturkammer (20) der Einrichtung (30) ausgesäten Zellen ermöglicht ist, sich ihre im individuellen Fall erforderlichen Lebens- und Wachstumsbedingungen selbst einzustellen.
2. Einrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Kombination folgender Merkmale:
  - a) Mittel (C) zum Ingangsetzen eines Flusses frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur kontinuierlichen Versorgung der dort ausgesäten Zellen;
  - b) Mittel (D) zum Ingangsetzen eines Stromes unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur konstanten, kontinuierlichen Begasung der dort ausgesäten Zellen;



- c) Mittel (E) zum geregelten bzw. gesteuerten Beheizen der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) in der Art und Weise, daß hierin eine konstante Temperatur während der Dauer eines Versuches gewährleistet ist;
  - d) Mittel (B) zum permanenten mikroskopischen Beobachten der innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) ausgesäten Zellen, ohne während der Dauer eines Versuches Proben dieser Zellkultur zu entnehmen;
  - e) Mittel (F) zum permanenten Messen sämtlicher relevanten Zellkulturparameter mittels entsprechender, in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) integrierter Sensoren; und
  - f) der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) zugeordnete Feedback-Regelungsmittel zur Optimierung von Inkubationsbedingungen in der Zellkulturkammer (20).
3. Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (30) eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturkammern (20) aufweist, die in Reihe geschaltet sind.
4. Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (30) eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturkammern (20) aufweist, die parallel geschaltet sind.
5. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, gekennzeichnet durch Mittel, um während der Dauer eines Versuchs die Art der flüssigen Medien und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder deren Durchflußmengen zu variieren.



6. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, gekennzeichnet durch Mittel, um während der Dauer eines Versuches die Art der Gase und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder Verteilung und/oder die Begasungskonzentrationen zu variieren.
7. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet durch Mittel (25), um die in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) herrschende Temperatur permanent zu messen und als Temperatur-Istwert einem entsprechenden Temperaturregel- bzw. Steuerkreis einzugeben, so daß die Beheizung der Zellkulturkammer (20) entsprechend geregelt bzw. gesteuert wird.
8. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch wenigstens eine Zellkulturkammer (20), in der eine gasdurchlässige Membran in der Weise angeordnet ist, daß zu beiden Seiten dieser Membran je eine Zellkultur unterschiedlicher Art zum Zwecke einer direkten Co-Kultivierung beider Zellkulturen ansetzbar ist, wobei Mittel zum Ingangsetzen eines ersten Medienflusses zu der einen Seite der Membran, d.h. der apikalen Seite mit der ersten Zellkultur, und eines gegenüber dem ersten Medienfluß unterschiedlichen, zweiten Medienflusses zu der anderen Seite der Membran, d.h. der basolateralen Seite mit der zweiten Zellkultur, vorgesehen sind.
9. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 8, gekennzeichnet durch ein videounterstütztes mikroskopisches Beobachtungssystem (B) zum Beobachten der wenigstens einen Zellkultur in der wenigstens einen Zellkulturkammer (20).



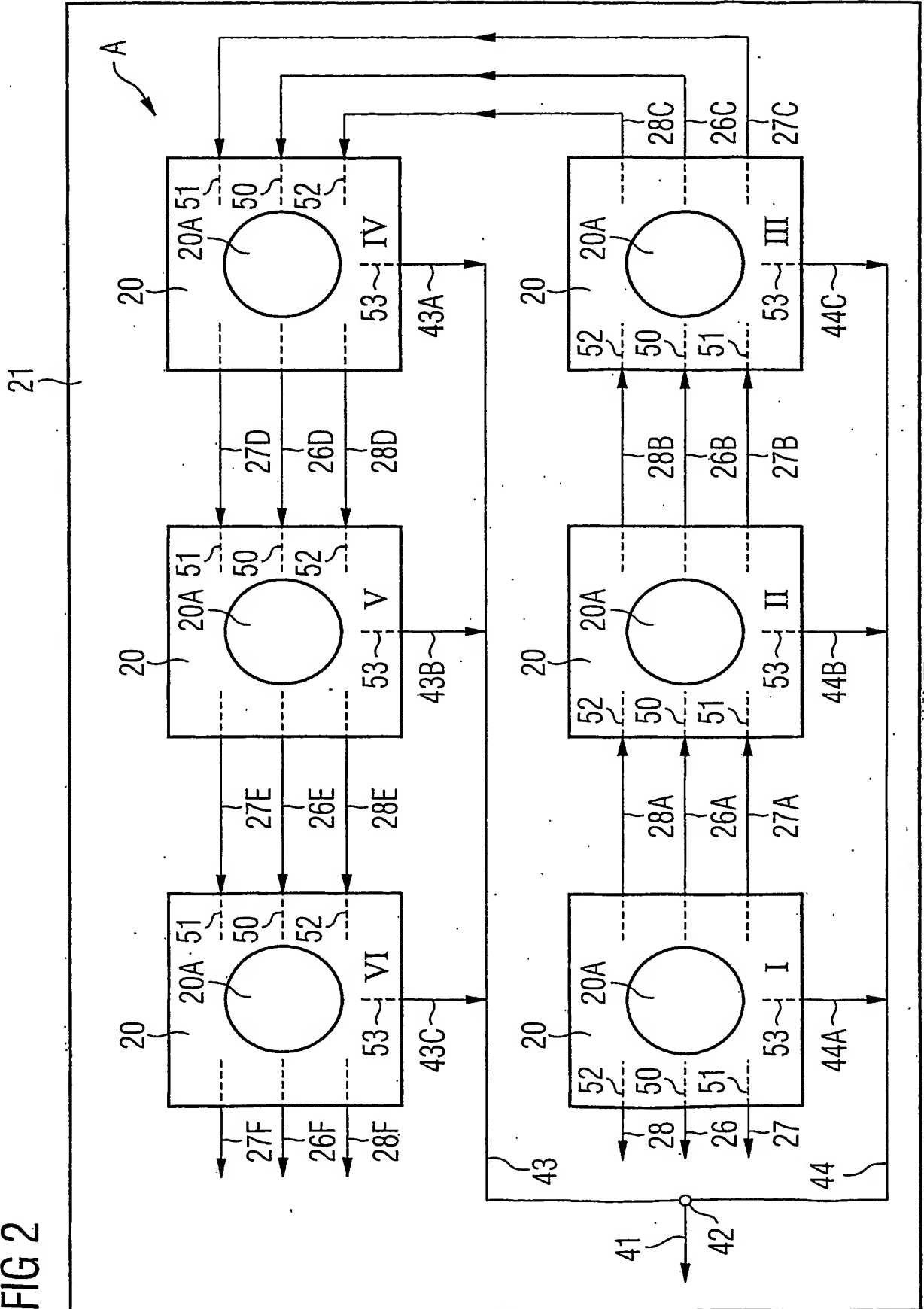
10. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, gekennzeichnet durch ein computergesteuertes Überwachungs- und Steuerungssystem (G), zu dem sämtliche Daten, die gewonnen werden durch
- permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) und/oder
  - permanentes Messen der relevanten Zellkulturparameter und/oder
  - permanentes Messen der in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) herrschenden Temperatur,
- zur dortigen Weiterverarbeitung und nachfolgenden entsprechenden Beaufschlagung der Feedback-Regelungsmittel übertragbar sind.
11. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10, gekennzeichnet durch ein software-unterstütztes Meßsystem zum permanenten Messen der relevanten Zellkulturparameter.
12. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellkulturkammern (20) zu einer geschlossenen Zellkammergruppierung (A) zusammengefaßt sind, die auf einer Basis (21) angeordnet ist, die ein Heizsystem (E) für die Inkubierung bildet.
13. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die Anwendung der Einrichtung zur indirekten Co-Kultivierung, wobei verschiedene biologische Systeme (d.h. Gewebe-/Zellarten) in entsprechenden Zellkulturkammern (20) hintereinandergeschaltet werden.







FIG 2





International Application No  
PCT/EP02/10358

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | US 5 424 209 A (KEARNEY GEORGE P)<br>13 June 1995 (1995-06-13)<br>Abstract, column 2, 5, 6, 18, 20<br>the whole document<br>--- | 1-13                  |
| X          | GB 2 341 611 A (ADDAVITA LTD)<br>22 March 2000 (2000-03-22)<br>page 3 -page 8<br>---  | 1                     |
| X          | EP 0 224 800 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>10 June 1987 (1987-06-10)<br>page 6 -page 7<br>---                                 | 1                     |
| X          | US 5 629 202 A (SU CHEIN-SHYONG ET AL)<br>13 May 1997 (1997-05-13)<br>figure 3<br>---   | 1                     |
|            | ---   |                       |
|            | -/--  |                       |

**X** Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T' later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

29 November 2002

Date of mailing of the international search report

02/01/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. S1 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Friedrich, C

**BEST AVAILABLE COPY**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/10358

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | CAMISARD V ET AL: "Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 1, 5 April 2002 (2002-04-05), pages 73-80, XP002222991<br>ISSN: 0006-3592<br>figure 1 | 2-13                  |
| A          | US 2001/039045 A1 (CHAN PAUL ET AL)<br>8 November 2001 (2001-11-08)<br>figure 1   | 2-13                  |
| A          | US 5 665 599 A (MINUTH WILL)<br>9 September 1997 (1997-09-09)<br>figure 2   | 2-13                  |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/10358

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|----|---------------------|---|--|
| US 5424209                                | A  | 13-06-1995          | NONE  |  |
| GB 2341611                                | A  | 22-03-2000          | AU 5430499 A<br>CA 2341876 A1<br>CN 1323343 T<br>EP 1121415 A1<br>WO 0012673 A1<br>JP 2002523082 T  | 21-03-2000<br>09-03-2000<br>21-11-2001<br>08-08-2001<br>09-03-2000<br>30-07-2002   |
| EP 0224800                                | A  | 10-06-1987          | DE 3541738 A1<br>AT 85357 T<br>DE 3687699 D1<br>EP 0224800 A2<br>ES 2038965 T3<br>JP 2006530 C<br>JP 7040928 B<br>JP 62130683 A<br>US 5286646 A | 27-05-1987<br>15-02-1993<br>18-03-1993<br>10-06-1987<br>16-08-1993<br>11-01-1996<br>10-05-1995<br>12-06-1987<br>15-02-1994 |
| US 5629202                                | A  | 13-05-1997          | NONE  |  |
| US 2001039045                             | A1 | 08-11-2001          | AU 4955901 A<br>WO 0172954 A2   | 08-10-2001<br>04-10-2001   |
| US 5665599                                | A  | 09-09-1997          | DE 4443902 C1<br>JP 2847669 B2<br>JP 8336382 A  | 18-04-1996<br>20-01-1999<br>24-12-1996   |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ... des Aktenzeichens

PCT/EP 02/10358

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12M3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                               | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | US 5 424 209 A (KEARNEY GEORGE P)<br>13. Juni 1995 (1995-06-13)<br>Abstract, column 2, 5, 6, 18, 20<br>das ganze Dokument<br>--- | 1-13               |
| X          | GB 2 341 611 A (ADDAVITA LTD)<br>22. März 2000 (2000-03-22)<br>Seite 3 -Seite 8<br>---   | 1                  |
| X          | EP 0 224 800 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>10. Juni 1987 (1987-06-10)<br>Seite 6 -Seite 7<br>---                               | 1                  |
| X          | US 5 629 202 A (SU CHEIN-SHYONG ET AL)<br>13. Mai 1997 (1997-05-13)<br>Abbildung 3<br>---<br>-/-                                 | 1                  |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. November 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/01/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Friedrich, C



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/8002/10358

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | CAMISARD V ET AL: "Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress."<br>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,<br>Bd. 78, Nr. 1, 5. April 2002 (2002-04-05),<br>Seiten 73-80, XP002222991<br>ISSN: 0006-3592<br>Abbildung 1 | 2-13               |
| A          | US 2001/039045 A1 (CHAN PAUL ET AL)<br>8. November 2001 (2001-11-08)<br>Abbildung 1  | 2-13               |
| A          | US 5 665 599 A (MINUTH WILL)<br>9. September 1997 (1997-09-09)<br>Abbildung 2  | 2-13               |

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

BEST AVAILABLE COPY



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung: zur selben Patentfamilie gehören

Inventor: Aktenzeichen  
PCT/EP 02/10358

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung  |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|--|
| US 5424209   | A                             | 13-06-1995                        | KEINE  |
| GB 2341611   | A                             | 22-03-2000                        | AU 5430499 A 21-03-2000<br>CA 2341876 A1 09-03-2000<br>CN 1323343 T 21-11-2001<br>EP 1121415 A1 08-08-2001<br>WO 0012673 A1 09-03-2000<br>JP 2002523082 T 30-07-2002   |
| EP 0224800   | A                             | 10-06-1987                        | DE 3541738 A1 27-05-1987<br>AT 85357 T 15-02-1993<br>DE 3687699 D1 18-03-1993<br>EP 0224800 A2 10-06-1987<br>ES 2038965 T3 16-08-1993<br>JP 2006530 C 11-01-1996<br>JP 7040928 B 10-05-1995<br>JP 62130683 A 12-06-1987<br>US 5286646 A 15-02-1994 |
| US 5629202   | A                             | 13-05-1997                        | KEINE  |
| US 2001039045                                      | A1                            | 08-11-2001                        | AU 4955901 A 08-10-2001<br>WO 0172954 A2 04-10-2001  |
| US 5665599   | A                             | 09-09-1997                        | DE 4443902 C1 18-04-1996<br>JP 2847669 B2 20-01-1999<br>JP 8336382 A 24-12-1996  |